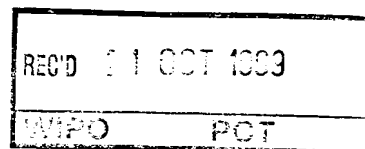


## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Bescheinigung

EP 99/5386

Herr Professor Dr. med. Michael Giesing in Recklinghausen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten sowie Sets zur Durchführung dieses Verfahrens

am 27. Juli 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 Q und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 20. September 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Aktenzeichen: 198 33 738.8

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

# Reitstötter, Kinzebach & Partner

Patentanwälte

Reitstötter, Kinzebach & Partner,  
Postfach 86 06 49, D-81633 München

Dr. Werner Kinzebach  
Dr. Peter Riedl  
Dr. Georg Schweiger  
Dr. J.Uwe Müller  
Prof. Dr.Dr.J. Reitstötter (1982)  
Dr. Wolfram Bunte (1976)  
Zugelassene Vertreter beim  
Europäischen Patentamt  
European Patent Attorneys  
Telefon: (089) 98 83 97 0  
Telefax: (089) 98 73 04 (Gr. III)  
Sternwartstr. 4, D-81679 München

München, 27. Juli 1998

Unsere Akte: M/39091  
Our Ref:

Professor  
Dr.med Michael Giesing  
Berghäuser Strasse 295  
  
D-45659 Recklinghausen

---

VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON KREBSZELLEN AUS ZELLHALTIGEN  
KÖRPERFLÜSSIGKEITEN SOWIE SETS ZUR DURCHFÜHRUNG DIESES  
VERFAHRENS

---

MÜNCHEN

LUDWIGSHAFEN

Sternwartstraße 4  
D-81679 München  
Ludwig-Platz 4  
D-67059 Ludwigshafen

Telefon (089) 998397-0  
Telefax (089) 987304  
Telefon (0621) 59139-0  
Telefax (0621) 628441

M/39 091

5 VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON KREBSZELLEN AUS ZELLHALTIGEN  
KÖRPERFLÜSSIGKEITEN SOWIE SETS ZUR DURCHFÜHRUNG  
DIESES VERFAHRENS

10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung  
von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten und Sets  
zur Durchführung dieses Verfahrens. Das erfindungsgemäße  
Verfahren beruht darauf, daß in einer zellhaltigen  
Körperflüssigkeit Zellen und Zellaggregate unterschiedlicher  
Größe und Gestalt anzutreffen sind. Die Isolierung von  
Krebszellen ist vor allem im Bereich der Onkologie für die  
15 Beantwortung diagnostischer, prognostischer und therapeutischer  
Fragestellungen von großer Bedeutung. Darüber hinaus dient das  
erfindungsgemäße Verfahren zur, gegebenenfalls vollständigen,  
Entnahme von Krebszellen aus zellhaltigen Flüssigkeiten oder  
zellhaltigen Fraktionen (Isolaten) davon.

20

Im Rahmen der Identifizierung und Charakterisierung  
disseminierter Krebszellen kann die Isolierung von Krebszellen  
entscheidende Bedeutung haben. Mißt man beispielsweise die  
Expression relevanter Gene durch Zellen einer zu untersuchenden  
25 Körperflüssigkeit, so ist eine Isolierung von Krebszellen dann  
nicht erforderlich, wenn die relevanten Gene von den  
üblicherweise in der Körperflüssigkeiten vorhandenen, nicht  
entarteten Zellen nicht oder nur in sehr geringem Maße  
exprimiert werden. Werden dagegen die relevanten Gene auch von  
30 den nicht entarteten Zellen exprimiert, ist es erforderlich,  
disseminierte Krebszellen zunächst zu isolieren und dann die  
Expression relevanter Gene zu messen. In diesem Falle bietet  
eine quantitative Analyse zur Expression bestimmter z.B.  
tumorbiologisch relevanter Nukleinsäuren (z.B. FAS-Ligand, FAS-  
35 Rezeptor, bax, bcl-2, Ki-67, Cycline, Adhesionsmoleküle) die  
Möglichkeit der Expressionszuordnung zum Tumorisolat.

Zwecks Charakterisierung der Tumorzellen ist es sinnvoll,

genomische Veränderungen der Tumorzellen auf DNA-Ebene zu analysieren. Bestimmungen wie "LOH (loss of heterozygosity), Mutationen, Amplifikationen etc." bedürfen einer extrem reinen Population von Tumorzellen, da verunreinigende "Wildtyp-Zellen" potentielle Genomveränderungen überdecken und so diese nicht mehr detektierbar machen. Durch das vorliegende Verfahren werden kontaminierende, wildtypexprimierende Zellen entfernt, so daß genomische Veränderungen der Krebszellen meßbar sind. CD45-positive Wildtyp-Zellen können dann als Bezugsgröße zur Messung von z.B. LOH's, Amplifikationen und Mutationen dienen.

Bekannte zu Isolationszwecken angebotene Verfahren führen vielfach zu einer lediglich unspezifischen Anreicherung von Krebszellen. Auch das in der US-A-5,529,903 beschriebene Leukopherese-Verfahren bietet keine spezifische Anreicherung von Krebszellen, sondern liefert Fraktionen, die zum überwiegenden Teil aus mononukleären Zellen bestehen, wie sie auch mit herkömmlichen Dichtegradienten erhalten werden können.

Dagegen kann die Isolierung von disseminierten Krebszellen bekanntermaßen mit Verfahren gelingen, bei denen die Krebszellen so markiert werden, daß sie von nicht entarteten Zellen zu unterscheiden sind und aufgrunddessen aussortiert werden können. Die überwiegende Anzahl derartiger Verfahren beruht auf einer antigenspezifischen Immunabsorption. Antikörper gegen bestimmte tumorspezifische oder epitheliale Zelloberflächenmoleküle werden beispielsweise mit fluoreszierenden und insbesondere magnetischen Markern versehen. Diese Verfahren haben den Nachteil, daß durch eine Quervernetzung der Oberflächenantigene unkalkulierbare Effekte, wie Apoptose, Anergie, Aktivierung und weitere Zustandsänderungen der Zellen auftreten können. Derartige Effekte können das Bild einer anschließenden Charakterisierung der isolierten Krebszellen drastisch verändern. So kann beispielsweise das Expressionsprofil einer Zelle innerhalb weniger Minuten beeinflußt werden. Verständlicherweise kann in solchen Fällen nicht ausgeschlossen werden, daß die so erhaltenen Analyseergebnisse Scheineigenschaften

wiederspiegeln, welche die disseminierten Krebszellen in der Körperflüssigkeit vor ihrer Isolierung nicht aufwiesen. Dies wäre aber wünschenswert. Ferner ist von Nachteil, daß die anhaftenden Antikörper nicht oder nur mit ungünstigen

5 Auswirkungen auf die Zelle entfernt werden können. Richten sich die Antikörper gegen intrazelluläre Bestandteile, ist sogar eine Fixierung und Perforierung der Zelle erforderlich, was deren Tod zur Folge hat. Unter derartigen Umständen sind sogenannte Bioassays, die mit lebenden und insbesondere  
10 vermehrungsfähigen Zellen arbeiten, mit großen Schwierigkeiten behaftet oder gar unmöglich. Ein weiterer Nachteil der Aufreinigung über Antikörper liegt in der Kreuzreaktivität bestimmter Epitope, so daß auch "normale" Zellen mit isoliert werden können.

15

Die Anforderungen, die an ein Verfahren zur Isolierung von Krebszellen im Rahmen der Identifizierung und Charakterisierung disseminierter Krebszellen gestellt werden müssen, sind hoch. Neben der üblicherweise im Hinblick auf das Verfahrensprodukt  
20 geforderten hohen Ausbeute und Reinheit, ist es im vorliegenden Fall vor allem die Authentizität der isolierten Krebszellen, welche die Brauchbarkeit eines derartigen Isolierungsverfahrens bestimmt. Die Krebszellen sollten möglichst unverändert aus der Körperflüssigkeit isoliert werden können, also nicht mit  
25 isolationstechnisch bedingten Konstrukten, wie Glasbeads behaftet sein. Sie sollten ex vivo kultiviert werden können und in Bio-Assays ein zuverlässiges Bild ihres ursprünglichen Zustandes in der Körperflüssigkeit wiedergeben.

30 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein schonendes Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten zur Verfügung zu stellen, das den Zustand dieser Krebszellen nicht oder nur unwesentlich beeinflusst.

35 Überraschenderweise wurde gefunden, daß es gelingt, Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten durch einen größen- und/oder gestaltabhängigen Trennvorgang zu isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Isolierung von Krebszellen aus zellhaltigen Körperflüssigkeiten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Zellen der zellhaltigen Körperflüssigkeit durch ein Sieb führt, das Krebszellen zurückhält.

Unter Sieb versteht man erfindungsgemäß ein Material, das einen größen- und gestaltabhängigen Trennvorgang ermöglicht. In der Regel handelt es sich um ein flächiges Material mit Öffnungen, die auch als Maschen bezeichnet werden. Die Größen der Öffnungen eines Siebes liegen in der Regel innerhalb eines bestimmten Bereichs. Die Angabe von Unter- und Obergrenze bedeutet nicht, daß auch Öffnungen mit genau diesen Grenzwerten auf dem Sieb vorhanden sein müssen. Wohl aber bedeutet diese Angabe, daß Öffnungen, deren Größe diese Werte unter- bzw. überschreitet, auf dem Sieb nicht vorhanden sind. Vorzugsweise liegen die Größen der Öffnungen eines Siebes innerhalb eines eng definierten Bereichs. Idealerweise sind sie im wesentlichen einheitlich. Die Größen der Öffnungen eines Siebes werden im folgenden als Maschenweite bezeichnet.

Gegebenenfalls sind auch poröse Körper, beispielsweise Filter, oder membranartige Materialien geeignet. Voraussetzung ist allerdings, daß die Porengröße hinreichend definiert ist.

Ein erfindungsgemäß einsetzbares Sieb weist in der Regel eine Maschenweite von 15 bis 200  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise von 17 bis 30  $\mu\text{m}$  und insbesondere von etwa 20  $\mu\text{m}$  auf. Für die Porenweite von Filtern und Membranen gilt entsprechendes.

Siebe aus lösungsmittelbeständigem Material sind für bestimmte Ausführungsformen der Erfindung von Vorteil. Bevorzugt werden lösungsmittelbeständige Kunststoffe, wie Polypropylen, Polytetrafluorethylen, hochfluorierte Polymere, Vinylidenfluorid, Aminoplaste, insbesondere Polyethylen. Auch Metalle, Gläser und andere mineralische Werkstoffe sowie bestimmte Naturfasern sind grundsätzlich geeignet.

In der Regel handelt es sich um Gewebe aus Fäden, Fasern, Filamenten oder Bündeln davon mit Öffnungen verschiedenster Geometrie. Auch für die Oberfläche der Fäden, Fasern, Filamente oder Bündel kommen verschiedene Ausführungen in Frage. So kann  
5 die Oberfläche gleichmäßig oder ungleichmäßig, beispielsweise glatt, kantig, wellig, zerfrantzt oder haarig sein. Ferner sind auch perforierte Platten geeignet, wobei ebenfalls Öffnungen verschiedenster Geometrie und Anordnung möglich sind.

10 Das Sieb kann ein- oder mehrschichtig sein. Für bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden einschichtige Siebe bevorzugt.

15 Zweckmäßigerweise ist das Sieb in einer Vorrichtung angeordnet, die es gestattet, die zellhaltige Flüssigkeit durch das Sieb zu führen und den Siebdurchgang aufzufangen. Das Sieb sollte dieser Vorrichtung auch entnommen werden können, um zusammen mit dem Siebrückstand weiteren Verfahrensschritten zugeführt werden zu können. Falls erforderlich, können auch Mittel zum  
20 Anlegen von Druck oder Unterdruck vorgesehen sein, um den Siebvorgang zu erleichtern. Geht dem Siebvorgang eine vorbereitende Aufarbeitung der zellhaltigen Körperflüssigkeit voraus, so kann es zweckmäßig sein, Vorrichtungen und Mittel zur Durchführung des Siebvorganges an Vorrichtungen und Mittel  
25 zur Durchführung der Aufarbeitung zu koppeln, wobei der Siebvorgang der Aufarbeitung nachgeschaltet wird. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Maßnahmen vorsehen, um den üblicherweise im Bereich der Biochemie und Molekularbiologie gestellten Anforderungen, wie Temperatur und Sterilität, zu  
30 genügen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auf all diejenigen zellhaltigen Körperflüssigkeiten angewendet werden, die Krebszellen und insbesondere disseminierte und metastasierte  
35 Krebszellen aufweisen. Dies sind beispielsweise Lymphe, Urin, Waschflüssigkeiten von Organen, z.B. Bronchiallavage oder Blasenspülflüssigkeit, und insbesondere Knochenmark und Blut. Derartige Körperflüssigkeiten können dem Siebvorgang direkt

zugeführt werden. Vielfach ist es allerdings von Vorteil, die zellhaltige Körperflüssigkeit zunächst einer vorbereitenden Aufarbeitung zu unterziehen. So kann man beispielsweise zelluläre von nicht-zellulären Bestandteilen trennen. Auch die  
5 zellulären Bestandteile können gegebenenfalls noch weiter aufgetrennt werden, indem man beispielsweise eine zellhaltige Fraktion isoliert, in der bekanntermaßen Krebszellen mitenthalt  
10 eingangs beschriebenen physikalischen Trennverfahren, wie die Dichtegradientenzentrifugation, an.

Werden Krebszellen aus Blut isoliert, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, zunächst Zellen des weißen Blutbildes durch Dichtegradientenzentrifugation abzutrennen. Krebszellen findet  
15 man vor allem in der Fraktion, die auch mononukleäre Zellen enthält, so daß diese Fraktion bevorzugt dem anschließenden Siebvorgang zugeführt wird.

Um dem Siebvorgang zugeführt werden zu können, sollten die  
20 zuvor aus einer Körperflüssigkeit isolierten zellhaltigen Fraktionen (Isolate) in Suspension vorliegen. Als Suspensionsmedium wählt man vorteilhafterweise einen Puffer oder ein Kulturmedium. Das Suspensionsmedium sollte möglichst keine Auswirkungen auf die interessierenden Eigenschaften der  
25 Zellen haben.

Bevor die zellhaltige Körperflüssigkeit oder Isolate davon durch ein Sieb führt, ist es für die spätere Auswertung von Vorteil, Aliquots an zellhaltiger Flüssigkeit abzunehmen.  
30 Derartige Proben können als Bezugsgröße für die an Siebrückstand und Siebdurchlauf ermittelten Meßwerte dienen.

Der Siebvorgang ist beendet, wenn die gesamte zellhaltige Flüssigkeit das Sieb passiert hat. Es kann sich ein  
35 Waschvorgang anschließen, bei dem weitere Flüssigkeit, vorzugsweise Puffer oder Kulturmedium, durch das Sieb geführt wird. Die Waschflüssigkeit kann zu dem zuvor gewonnenen Siebdurchlauf gegeben oder auch getrennt davon gesammelt und



gegebenfalls verworfen werden.

Die auf dem Sieb zurückgehaltenen Krebszellen können direkt der sich anschließenden Charakterisierung dieser Zellen zugeführt werden. Vorteilhafterweise werden die Krebszellen allerdings zunächst vom Sieb abgelöst. Je nach Art der anschließenden Charakterisierung kann man zu diesem Zweck verschiedene Vorgehensweisen wählen.

- 10 Eine Möglichkeit besteht darin, die auf dem Sieb zurückgehaltenen Krebszellen abzuwaschen, indem man eine geeignete Flüssigkeit in entgegengesetzter Richtung durch das Sieb führt und die zellhaltige Waschflüssigkeit gewinnt. Die abgelösten Zellen können dann gewünschtenfalls aus der
- 15 Zellsuspension pelletiert werden.

- Auch ist es möglich, die am Sieb anhaftenden Krebszellen unter Schwerkrafteinwirkung abzulösen. Dies gelingt beispielsweise, indem man das Sieb so in eine geeignete Flüssigkeit gibt, daß
- 20 die Krebszellen durch Zentrifugation pelletiert werden können. Auf diese Weise können die Krebszellen direkt in ein Medium überführt werden, das für die nachfolgende Charakterisierung geeignet ist.

- 25 Eine weitere Möglichkeit, die auch zum Ablösen der Zellen vom Sieb führt, durch die diese Zellen allerdings gleichzeitig zerstört werden, besteht darin, das Sieb samt anhaftender Krebszellen den der Gewinnung von Nukleinsäuren und Proteinen dienenden Verfahren zuzuführen. Sofern derartige Maßnahmen den
- 30 Einsatz organischer Lösungsmittel erfordern, beispielsweise die in diesem Bereich vielfach zur Isolierung von Gesamt-RNA, DNA und Proteinen verwendeten Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen, benutzt werden, sind Siebe aus lösungsmittelbeständigen Materialien bevorzugt.

35

Erfordert die Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Krebszellen eine vorherige Isolierung von Nukleinsäuren, Proteinen oder anderen Zellbestandteilen, so

sind dem Fachmann eine Vielzahl verschiedener Verfahren bekannt, mit denen er dieses bewerkstelligen kann. Beispielhaft seien hier lediglich einige wenige Methoden aufgezeigt.

5

Zur Isolierung genomischer DNA kann man die Zellen, beispielsweise unter Einwirkung von Detergentien und/oder Proteinasen, lysieren, Proteine entfernen und die DNA, beispielsweise durch Ausfällen mit bekannten organischen

10

Lösungsmitteln, isolieren. Verfahren auf Basis von Guanidinisothiocyanat und Phenol enthaltenden Lösungen werden bevorzugt. Auch eine chromatographische Trennung,

beispielsweise mit handelsüblichen Spin-Säulen, kann sinnvoll sein. Ähnliche Verfahrensmaßnahmen finden bei der Isolierung

15

von Gesamt-RNA Anwendung. Aus dieser Gesamt-RNA kann wiederum mRNA isoliert werden, indem man auf Oligo-(dT) basierende Systeme verwendet. Die Wahl eines zweckmäßigen Protokolls unterliegt fachmännischem Wissen.

20

Die isolierten Nukleinsäuren können dann zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung in einer Vielzahl von Applikationen eingesetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise die PCR, RT-PCR, DD-RT-PCR, cDNA-Synthese, Primerextension, restriktionsenzymatische Verdauung, Southern-Blotting,

25

Markierungs- und Modifizierungsreaktionen, Northern-Blotting, Klonierung, Sequenzierung, in vitro-Transcription oder in vitro-Translation. Die Wahl einer geeigneten Applikation hängt nicht nur von der Art der Nukleinsäure, sondern auch von der genetischen Information ab, anhand derer die Krebszelle

30

identifiziert und charakterisiert werden soll.

Die Identifizierung und Charakterisierung isolierter Krebszellen beinhaltet die Durchführung krebsnachweisender Analysen, beispielsweise Analysen der Nukleinsäuren auf

35

Mutationen, Insertionen, Deletionen, LOH, Amplifikationen, Aberrationen im Chromosomensatz und dergleichen; tumorbiologisch relevanter Analysen zur Messung verschiedenster zellphysiologischer Parameter, die beispielsweise mit der

Metastasierung, dem Zellzyklus, der Proliferation oder der Apoptose von Krebszellen zusammenhängen; Analysen pharmakologisch relevanter Parameter, wobei die isolierten Zellen in vitro unter verschiedenen Bedingungen, beispielsweise unter Zusatz von Cytostatika, Antagonisten und dergleichen kultiviert werden, so daß verschiedene Therapieformen in vitro getestet und für jeden Patienten individuell optimiert werden können; Bioassays, in denen Aktivierungen, Inhibitionen oder sonstige Veränderungen der isolierten Krebszellen durch zellwirksame Moleküle, wie Cytokine, Chemokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Liganden, chemische oder biologische Analoga, die Apoptisierbarkeit der isolierten Krebszellen oder deren apoptisches Potential gegenüber anderen Targetzellen oder auch die Strahlungssensitivität der isolierten Krebszellen zur individuellen Dosisabschätzung für einen Patienten bestimmt werden können; cytologische Analysen, unter Anwendung bekannter Methoden, wie der Immunhistochemie, Gegenfärbung, FISH- oder sonstiger cytologischer Nachweis- und Färbeverfahren. Folgende Analysen seien beispielhaft genannt:

-- Krebsnachweisende DNA/RNA-Analysen, die Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene, wie p53, Gene der ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2, c-fos, DPC4, FAP, nm23, RET, WT1 u.ä., LOH's, beispielsweise im Hinblick auf p53, DCC, APC, Rb u.ä. sowie BRCA1 und BRCA2 bei hereditären Tumoren, Mikrosatelliten-Instabilität von MSH2, MLH1, WT1 u.ä., tumoröse RNA's, wie CEA, Cytokeratine, z.B. CK20, MUC1, MAGE3, Muc18, Tyrosinase, PSA, PSM, BA46, Mage-1 u.ä., oder morphogene RNA's, wie Maspin, HCG, GIP, Motilin, hTG, SCCA-1, AR, ÖR, PR, verschiedene Hormone u.ä., betreffen;

-- Analysen tumorbiologisch-relevanter RNA's und Proteine, die das Metastasierungsprofil, d.h. die Expression von Angiogenese-, Motilitäts-, Adhäsions- und Matrixdegradationsmolekülen, wie bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R's, wie VEGF-R1 oder VEGF-R2, E-Cadherin, Integrine, Selectine, MMP's, TIMP's, SF, SF-R u.ä., das Zellzyklus- bzw. Proliferationsprofil, wie Cyclin, Ki67, P120, p21, PCNA u.ä., oder das Apoptose-Profil,

wie FAS (L+R), TNF (L+R), Perforin, Granzyme B, BAX, bcl-2, Caspase 3 u.ä. , betreffen.

Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäß resultierende  
5 hohe Reinheit und isolationstechnische Unberührtheit der  
isolierten Krebszellen. Dies ermöglicht es, bestimmte  
Funktionsteste z.B. im Hinblick auf Pharmakogenomics (Test mit  
bestimmten Wirkstoffen) oder auf Veränderungen der isolierten  
Tumorzellen (Gen-Therapy, Gen-Replacement) durchzuführen.  
10 Desweiteren kann, durch die Reinheit der Zellen bedingt, ein  
sogenanntes "Drug-Targeting" durchgeführt werden. So ist z.B.  
aufgrund einer nachgewiesenen erb-B2 Amplifikation eine  
Therapie mit anti-erb-B2 Antikörpern oder anderen Liganden  
angezeigt; Progesteron- oder Östrogenrezeptor-exprimierende  
15 Tumorzellen sind einer sogenannten anti-Hormon-Therapie  
zugänglich. Weist man in den Krebszellen beispielsweise eine  
Mutation des Genes für  $\beta$ -Tubulin nach, so würde dies eine  
Kontraindikation von Taxol® darstellen. Gleiches gilt für den  
Nachweis bestimmter Splicevarianten des Östrogenrezeptors im  
20 Hinblick auf Tamoxifen®. Ebenso ist es möglich, die isolierten  
Tumorzellen im Rahmen von Vaccinen einzusetzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann ebenso zur, gegebenenfalls  
vollständigen, Entnahme kontaminierender Krebszellen aus  
25 Zellgemischen, d.h. zellhaltigen Körperflüssigkeiten oder aus  
Isolaten davon, angewendet werden (Depletion). Nach Bestrahlung  
und/oder Chemotherapie erhalten viele Tumorpatienten autologe  
Zellisolate. Diese Zellen, beispielsweise Apherese-Produkte,  
isolierte Stammzellen und dergleichen, können mit dem  
30 erfindungsgemäßen Verfahren auf schonende Weise von Krebszellen  
befreit werden. Das Risiko eines Rezidivs durch kontaminierende  
Krebszellen kann so reduziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Sets  
35 zur Isolierung und anschließender Identifizierung und  
Charakterisierung dissemiierter und metastasierter  
Krebszellen. Auch Sets zur Depletion von Krebszellen aus  
zellhaltigen Körperflüssigkeiten oder Isolaten sind Gegenstand

der Erfindung. Derartige Sets sollten möglichst einfach zu handhaben und im wesentlichen gebrauchsfertig sein. Eine bevorzugte Anordnung bietet die Sets in Kit-Form an. Essentielle Komponente geeigneter Sets ist wenigstens ein Sieb.

5 Zusätzlich können Komponenten vorhanden sein, die es ermöglichen,

- zellhaltige Körperflüssigkeit oder Teile davon durch das Sieb zu führen, beispielsweise säulenartige Teile, in denen das Sieb zweckmäßig angeordnet und vorzugsweise auch  
10 wieder entfernt werden kann;
- den Siebdurchlauf aufzufangen;
- die Zellen oder Zellbestandteile vom Sieb abzulösen und/oder diese dann aufzunehmen, beispielsweise Lösungen, wie Puffer, Kulturmedien oder organische Lösungsmittel und/oder Lösungsgemische, wie Ethanol, Chloroform,  
15 Isoamylalkohol, Isopropanol, Guanidinisothiocyanat, Phenol und Gemische davon, z.B. Trizol®, vorzugsweise als gebrauchsfertige Lösungen oder Lösungsmittelgemische, die in vorzugsweise zentrifugierbaren Behältnissen und auch  
20 getrennt von diesen angeboten werden können;
- Nukleinsäuren, Proteine oder andere Zellbestandteile der isolierten Krebszellen zu isolieren oder zumindest für eine im Hinblick auf anschließende Analysen zweckmäßige Isolierung vorzubereiten, beispielsweise die zuvor  
25 genannten Lösungen, Spin-Säulen mit geeigneten Festphasen, Oligo-dT-Systeme u.ä..

Derartige Sets sind universell einsetzbar und weitgehend von der Art der gegebenenfalls durchzuführenden vorbereitenden Aufarbeitung der zellhaltigen Körperflüssigkeit und den sich  
30 anschließenden, zur Identifizierung und Charakterisierung isolierter Krebszellen vorzunehmenden Analysen unabhängig.

Ferner können Komponenten vorhanden sein, die es ermöglichen,

- eine vorbereitende Aufarbeitung der zellhaltigen  
35 Körperflüssigkeit durchzuführen, beispielsweise zur Isolierung von Zellen oder bestimmter zellhaltiger Fraktionen aus dieser Körperflüssigkeit;
- die zur Identifizierung und Charakterisierung isolierter

Krebszellen angestrebten Analysen, insbesondere Untersuchungen der oben genannten Gene und Proteine, durchzuführen.

Aufgrund der Vielfalt derartiger Maßnahmen sind diese

- 5 Komponenten - wenn überhaupt - in der Regel nur in beschränktem Umfang in dem erfindungsgemäßen Set untergebracht, d.h. es wird jeweils auf eine bestimmte Körperflüssigkeit und/oder eine oder wenige Analysen abgestellt. Es handelt sich dann um Kits zur Durchführung einer Identifizierung und Charakterisierung
- 10 isolierter Krebszellen anhand eines oder weniger Parameter.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

#### 15 Beispiel 1

##### **Isolierung disseminierter Krebszellen aus Blut.**

- 10 ml heparinisiertes Blut werden abzentrifugiert (400 g; 10 min; RT). Das überstehende Plasma wird abgenommen. Die pelletierten Zellen werden in 12 ml PBS aufgenommen. Nach
- 20 Dichtegradientenzentrifugation (Nycodenz 1.077; 800 g; 30 min, RT) werden die Interphasezellen (mononukleäre Zellen, kurz MNC) abgenommen und 2 x in 10 ml PBS (1 mM EDTA) gewaschen (400 g; 10 min; 4°C). Die MNC's werden in 10 ml PBS aufgenommen (1 mM EDTA, 0,5 % BSA). Als Bezugsgröße wird 1 ml dieses
- 25 Zellgemisches abgenommen (Kontrollfraktion). Die restlichen 9 ml Zellgemisch werden über eine Säule durch ein aus PE-Fäden gewebtes Sieb mit 20 µm Maschenweite (vertrieben von der SEFAR AG, Rüslikon, Schweiz) geführt und der Siebdurchlauf gesammelt. Die Säule wird 5 x mit je 10 ml PBS (1 mM EDTA)
- 30 gewaschen. Das Sieb wird herausgenommen, umgedreht und in einem Reaktionsgefäß mit 0,7 ml Trizol® inkubiert (5 min; RT). Das Sieb wird im Reaktionsgefäß oberhalb der Trizol®-Lösung plaziert und abzentrifugiert (200 g; 30 s; RT). Das trockene Sieb wird entfernt und die Trizol®-Lösung der weiteren RNA/DNA-
- 35 Isolation zugeführt.

Alternativ zur Inkubation des Siebes in Trizol® kann das Sieb der Säule entnommen, umgedreht und in PBS (1 mM EDTA, 0,5 %

BSA) überführt werden, und die Zellen können durch Zentrifugation (400 g; 10 min, 4°C) pelletiert werden.

## 5 Beispiel 2

### **Isolierung von CD45-positiven Zellen (Kontrollfraktion)**

Zur Isolierung von CD45-positiven Lymphozyten als Kontrollfraktionen und auch für die Messung von LOH's werden jeweils 1/10 der MNC's vor und nach dem Siebvorgang (siehe  
10 Beispiel 1) abgenommen. Diese werden in ein 1 ml PBS (0.5% BSA, 100 µg hu-IgG) enthaltendes Reaktionsgefäß überführt. Dazu werden 50 µl gewaschene anti-CD45 Microbeads gegeben. Der Ansatz rotiert bei 4°C 20 min. Anschließend wird das Reaktionsgefäß so an einer Magnetleiste positioniert, daß die  
15 Microbeads (gebunden an CD45-positive MNC's) an der Gefäßwand pelletieren. Durch dreimaliges Waschen der Bead-Zell-Aggregate erhält man eine reine Population CD45-positiver Lymphozyten, welche dann in Trizol® gelöst der Isolation von Nukleinsäuren zugeführt werden können. CD45-Isolate der MNC's vor dem  
20 Siebvorgang werden als Kontrollfraktion A bezeichnet, CD45-positive Isolate der MNC's nach dem Siebvorgang als Kontrollfraktion B.

## Beispiel 3

### 25 **DNA-Analysen**

Genomische DNA wird in herkömmlicher Weise aus den in den Beispielen 1 und 2 erhaltenen Trizol®-Lösungen isoliert. Die DNA wird dann durch PCR amplifiziert, wobei man die nachstehend angegebenen Primer und Parameter verwendet.

# 1. Analyse der p53, Rb, DCC und APC Allele:

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu$ l):

5	10-fach PCR-Puffer	5
	20 mM dNTP	0.5
	Primer A	0.5
	Primer B	0.5
	TAQ-Polymerase	
10	+ TAQ-Start-Antikörper	
	1:1	0.5
	H <sub>2</sub> O	40
	DNA	3

15 Folgende Temperaturprofile werden benutzt:

für APC, Rb und DCC:

	<u>95 °C</u>	<u>5 min</u>	
	94 °C	30 sec	
20	53 °C	30 sec	35 x
	<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>	
	72°C	5 min	

für p53

25	<u>95 °C</u>	<u>5 min</u>	
	94 °C	30 sec	
	62 °C	30 sec	35 x
	<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>	
	72°C	5 min	

30

Als Primerpaare werden benutzt:

**p53-LOH:**

A: 5'-Fl-Agg gAT ACT ATT CAg CCC CAg gTg

35 B: 5'-ACT gCC ACT CCT TgC CCC ATT C



**APC-LOH**

A: 5'-FAM-gTA AgC Agg ACA AgA TgA Cag  
 B: 5'-gCT ATT CTC TCA ggA TCT Tg

**5 DCC-LOH**

A: 5'-HEX-gAT gAC ATT TTC CCT CTA g  
 B: 5'-gTg gTT ATT gCC Ttg AAA Ag

**Rb-LOH**

10 A: 5'-FAM-CTC CTC CCT ACT TAC Ttg T  
 B: 5'-AAT TAA CAA ggT gTg gTg g

Alle Primer werden in einer Konzentration von 20 pmol/ $\mu$ l gelagert. Normale DNA wird immer als negative Kontrolle eingesetzt. Alle PCR-Amplifikate der LOH- und Amplifikationsanalysen werden auf einem ABI-Prism Genescan Genetic Analyser gemessen und ausgewertet.

**2. Amplifikationsanalyse von erb-B2 und c-myc**

Gemessen wird eine Coamplifikation von erb-B2 (c-myc) versus  $\beta$ -Globin.

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu$ l):

	<b>c-myc</b>	<b>erb-B2</b>
10-fach PCR-Puffer	5	5
MgCl (25 mM)	4	4
20 mM dNTP	0.25	0.25
30 Primer A	2	1.5
Primer B	2	1.5
$\beta$ -Globin-Primer A	0.2	0.5
$\beta$ -Globin-Primer B	0.2	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.5	7.5
35 AmpliTaQ Gold	0.4	0.4
H <sub>2</sub> O	25.45	25.85
DNA	3	3

Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

	<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>	
	95 °C	60 sec	
5	60 °C	60 sec	32x
	<u>72 °C</u>	<u>60 sec</u>	
	72 °C	3 min	

Als Primerpaare werden benutzt:

10

#### **erb-B2**

A: 5'-HEX-Cgg ATC TTC TgC TgC CgT Cg  
B: 5'-CCT Ctg Acg TCC ATC ATC TC

15

#### **c-myc**

A: 5'-HEX-CgT ATT CAT gCC Ttg TAT Ttg  
B: 5'-CTT CTT CAT CTT CTT gTT CC

#### **Globin**

20

A: 5'-FAM-ACA CAA Ctg TgT TCA CTA gC  
B: 5'-CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC

Alle Primer werden in einer Konzentration von 20 pmol/ $\mu$ l gelagert. Normale DNA wird immer als negative Kontrolle und 5-fach amplifizierte (erb-B2/c-myc) DNA als positive Kontrolle eingesetzt. Alle PCR-Amplifikate der LOH- und Amplifikationsanalysen werden auf einem ABI-Prism Genescan Genetic Analyser gemessen und ausgewertet.

30

#### **Beispiel 4**

##### **Klinische Anwendung**

14 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen, ein Patient mit malignem Melanom, sechs Kontrollspender und ein im Vorbefund auffälliger "Normalspender" wurden untersucht. Es wurden

35

Analysen tumorspezifischer und tumorassoziierter RNA's sowie genomischer Analysen auf "allele imbalance" (LOH) der Gene p53, Rb, APC und DCC sowie Amplifikationsanalysen der Onkogene c-myc und erb-B2 durchgeführt.